

针对人活化蛋白 C 的单克隆抗体及其制备和应用

技术领域

本发明属于单克隆抗体技术领域，涉及针对人活化蛋白 C（aPC）的单克隆抗体及其应用。

背景技术

蛋白C（PC）通路在调节凝血和炎症中起关键作用。凝血酶与血管内皮细胞上的凝血酶调节蛋白（TM）形成复合物，从而激活蛋白C，活化蛋白C（aPC）裂解活化的因子V和因子VIII，从而负面地调节凝血酶的形成并维持体内血栓形成和止血的平衡。aPC保护动物减少内毒素（LPS）或大肠杆菌的侵害。重组人aPC产品被FDA批准为治疗人严重败血症的首种药物。目前尚未完全了解aPC抗炎和细胞保护的分子机制。突变研究表明，aPC的抗凝血活性显然不是aPC对内皮细胞抗凋亡作用所必需的。血管内皮细胞蛋白C受体（EPCR）主要在大血管内皮上表达，并通过凝血酶-TM复合物增强蛋白C的激活。最近，结合EPCR的aPC被证明可以在内皮细胞上裂解PAR-1，并且该研究表明，aPC信号传导的所有抗炎和抗凋亡作用都是在内皮细胞中由PAR-1介导的。但是，在致死剂量LPS攻击下，PAR-1缺陷型小鼠的表型与其野生型对照小鼠相似，这表明PAR-1可能不是aPC信号调节炎症和凋亡的唯一参与者。

鉴于aPC在体内调节病理生理功能中的核心作用，已生产出一种单克隆抗体HAPC1573，该抗体特异性识别人类活性形式的蛋白C（aPC）而非蛋白C（Xu，US8153766B2，US9127072B2）。该抗体改变了aPC对发色肽底物的酰胺分解活性，并阻断了血浆中的aPC抗凝活性。更重要的是，该抗体不会影响aPC裂解细胞外组蛋白H3和H4，也不会影响aPC对内皮细胞凝血酶诱导的通透性的细胞保护活性。MAPC1591是一种抗小鼠aPC的单克隆抗体，具有与HAPC1573类似的功能，可阻断小鼠aPC的抗凝活性并保持其细胞保护活性，从而使血友病A免受创伤性出血的侵扰，这表明抗aPC抗体可以适用于诸如血友病，创伤和败血症等临床环境。

赵等人报道了仅针对抗凝活性而不针对aPC的其他活性的HAPC1573和人源化HAPC1573的CDR序列，它们在急性获得性血友病A猴模型中显示了针对出血的体内保护作用（Zhao，US9657111B2，WO2017 / 087391A1，Nat. Communications 2020）。aPC和人源化的HAPC1573 Fab复合物的X射线晶体结构

表明 HAPC 1573 可能不结合 aPC 的活性位点，而是结合到包含已知 aPC-FVa 结合点的 aPC 自溶环。因此，人源化的 HAPC1573 可能通过干扰 aPC 和 FVa 的相互作用来抑制 aPC 的抗凝血功能。人源化 HAPC1573 的抑制作用仅限于 aPC 的抗凝活性，而不会影响其细胞保护，抗炎和细胞信号传导功能。据报道人血浆中 aPC 浓度约为 40 pm，根据表面等离子共振分析，人源化 HAPC 1573 对 aPC 的亲合力为 10 nM。在基于 Protac 的 APTT 凝血分析中证明了 HAPC 1573 在人乏 FVIII 血浆和人乏 FIX 血浆中缩短 APTT 延长的浓度依赖性效应。即使在浓度为 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 的情况下，HAPC 1573 仍无法在此离体实验中达到对 aPC 抗凝活性的最大抑制作用。该观察结果与在急性获得性凝血病模型中使用的人源化 HAPC 1573 的体内观察结果一致。在动物研究中，发现 10 mg / kg 和 30 mg / kg 较高剂量的 HAPC1573 才可提供较大的保护作用。但是如此高的剂量并不适合临床使用，所以更高亲和力的人源化的 HAPC 1573 是 aPC 未来的潜在治疗应用的前提和保证。

发明内容

本发明一个方面是提供一种抗 aPC 单克隆抗体，所述抗 aPC 单克隆抗体包括原始抗体以及在该原始抗体进行如下 6 个突变位点中的一个或多个突变得到的突变抗体，

其中，所述原始抗体包含：

(a) 由 SEQ ID NO: 27、28 和 29 序列的任意一个或多个表示的重链 CDR；
和/或，

(b) 由 SEQ ID NO: 30、31 和 32 序列的任意一个或多个表示的轻链 CDR；

其中，所述 6 个突变位点分别是：

- 1) 位于 VL CDR2 的 N57R/W；
- 2) 位于 VL CDR2 的 E59G/P；
- 3) 位于 VL CDR3 的 Q93V；
- 4) 位于 VH CDR1 的 N31F；
- 5) 位于 VH CDR2 的 S55K；
- 6) 位于 VH CDR3 的 Y104T。

本发明中，所述抗 aPC 单克隆抗体的恒定区包含人 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 序列中的一种或几种。

优选地，本发明中，所述抗 aPC 单克隆抗体在原始抗体进行的突变位点至少包括：位于 VH CDR1 的 N31F；位于 VH CDR2 的 S55K；位于 VL CDR2 的 N57R；和位于 VL CDR2 的 E59G。

优选地，本发明中，所述抗 aPC 单克隆抗体在原始抗体进行的突变位点至少包括：位于 VL CDR2 的 N57R；位于 VL CDR2 的 E59G；位于 VL CDR3 的 Q93V；位于 VH CDR1 的 N31F；和位于 VH CDR2 的 S55K。

本发明另一方面是提供所述的抗 aPC 单克隆抗体相关的生物材料，为以下 1)至 10)中任意的一种或几种：

- 1) 编码根据如上所述的抗 aPC 单克隆抗体的核酸分子；
- 2) 含有 1)所述核酸分子的表达盒；
- 3) 含有 1)所述核酸分子的构建体；
- 4) 含有 2)所述表达盒的构建体；
- 5) 含有 1)所述核酸分子的表达系统；
- 6) 含有 2)所述表达盒的表达系统；
- 7) 含有 3)所述构建体的表达系统；
- 8) 含有 4)所述重组载体的表达系统；
- 9) 扩增编码根据如上所述的抗 aPC 单克隆抗体的氨基酸序列的核酸分子的引物对；
- 10) 含有根据如上所述的抗 aPC 单克隆抗体的融合抗体。

本发明另一方面是提供制剂产品，所述制剂产品为药物组合物或检测试剂盒；所述制剂产品包含如上所述的抗 aPC 单克隆抗体或其相关生物材料之任意的一种或几种。当所述制剂产品为药物组合物时，其还包含药学上可接受的载体。

本发明另一方面是提供一种治疗凝血相关的方法，包括向有治疗需要的个体施用有效量的如上所述的抗 aPC 单克隆抗体或其相关生物材料。其中，所述个体患有凝血缺乏或缺陷病症，或所述个体需要血液凝固治疗，或所述个体患有败血病或血友病，或所述个体需要调节止血。

本发明另一方面是提供所述抗 aPC 单克隆抗体或其相关生物材料在制备预防和/或治疗凝血缺乏或缺陷病症的药物中的应用。其中，所述凝血缺乏或缺陷病症包括因凝血因子缺乏造成凝血障碍并引起出血的病症，以及由创伤、手术引

起的凝血紊乱等。进一步地，所述凝血缺乏或缺陷病症包括血友病、败血病、创伤性出血等。

本发明另一方面是提供所述抗 aPC 单克隆抗体或其相关生物材料在制备增强 aPC 切割组蛋白 H3 和 H4 能力的促进剂中的应用，或在制备抑制个体中的活化蛋白 C 抗凝活性的药物中的应用，或在制备预防和/或治疗需要血液凝固的个体的药物中的应用，或在制备预防和/或治疗患有败血病的个体的药物中的应用或在制备预防和/或治疗患有血友病的个体的药物中的应用，或在制备调节个体止血的药物中的应用或，在非疾病诊断治疗目的的免疫学检查分析或在制备 aPC 的检测试剂或试剂盒中的应用，或在与其他试剂或药物联合使用中的应用。

本发明另一方面提供一种如上所述抗 aPC 单克隆抗体的制备方法，所述方法包括如下步骤：在适合表达所述抗 aPC 单克隆抗体的条件下，培养所述抗 aPC 单克隆抗体的表达系统，从而表达出所述抗 aPC 单克隆抗体。

本发明的有益效果在于，本发明提供的抗 aPC 单克隆抗体是人源化抗体，是对 HAPC 1573 人源化，或同时进行单位点和组合位点的突变筛选得到，其与活化蛋白 C 选择性结合且抑制活化蛋白 C，而不与未活化的蛋白 C 结合或抑制未活化的蛋白 C。其与人的活化蛋白 C 选择性结合，而不与其他物种的活化蛋白 C 或未活化的蛋白 C 结合。所述抗体的亲和力显著提高，部分抗体的亲和力比 HAPC 1573 提高 100 倍。在基于 Protac 的 APTT 凝血分析中，本发明使用很少量的抗体，如 1 μ g/ml 即可对 aPC 抗凝活性产生最大抑制作用，所述抗体可潜在地阻断 aPC 的抗凝活性，应用于凝血缺乏或缺陷病症的治疗具有广泛应用前景。

附图说明

图 1 为人源化抗 aPC 单克隆抗体（Humab001-1~Humab001-28 或 HAPC-1~HAPC-28）与人 aPC 蛋白的结合力。

图 2 为人源化抗 aPC 单克隆抗体（Humab001-1~Humab001-28 或 HAPC-1~HAPC-28）与人 PC 蛋白的结合力。

图 3 为 HAPC-14 的突变抗体（HAPC14-1~ HAPC14-10 或 HAPC-14-1~HAPC-14-10）与 hAPC/hPC 的结合力；其中，图 3A~3D 的横坐标分别为 10^{-6} 、 10^{-4} 、 10^{-2} 、 10^0 、 10^2 、 10^4 nM。

图 4 为 HAPC-14 的突变抗体（HAPC14-1~ HAPC14-10 或 HAPC-14-1~HAPC-14-10）的亲和力测定。

图 5 为 HAPC-14 的突变抗体 HAPC-14-6 对 aPC 切割组蛋白能力的影响。

图 6 为体外药效学实验。HAPC-14 的突变抗体 HAPC-14-3、HAPC-14-6 对乏凝血因子的血浆中抑制 aPC 抗凝活性的功能；A：针对乏凝血因子 FVIII 血浆，B：针对乏凝血因子 FIX 血浆，C：针对乏凝血因子 FXI 血浆，D：针对乏凝血因子 FVII 血浆，E：针对乏凝血因子 FXII 血浆，F：针对乏凝血因子 FV 血浆，G：针对乏凝血因子 FX 血浆，H：针对乏 VWF 血浆。

图 7 为体内药效学实验。其中，A：向 FVIII 凝血因子缺陷的小鼠注射凝血因子 FVIII、HAPC1573、HAPC-14-6 对缺陷小鼠凝血功能的影响；B：向 FVIII 凝血因子缺陷的小鼠注射不同剂量 HAPC-14-6 对缺陷小鼠凝血功能的影响；C：向 FIX 凝血因子缺陷的小鼠注射 HAPC1573、不同剂量 HAPC-14-6 对缺陷小鼠凝血功能的影响。

具体实施方式

本发明对 HAPC 1573 人源化后再进行亲和力优化，通过 Fab 的方式进行优化突变位点的筛选，最终筛选到较优的 6 个位点，进一步通过组合突变，得到的优化突变体的亲和力比 HAPC 1573 提高了 100 倍，且在基于 Protac 的 APTT 凝血分析中，1 μ g/ml 的突变抗体量就可以达到对 aPC 抗凝活性的最大抑制作用，具备了进一步应用到临床的可能性。

本发明提供一种抗 aPC 抗体即抗 aPC 单克隆抗体 14（HAPC-14），所述抗体包含：

（a）包含由 SEQ ID NO: 27、28 和 29 任一或几个序列表示的重链 CDR 的重链；和/或，

（b）包含由 SEQ ID NO: 30、31 和 32 任一或几个序列表示的轻链 CDR 的轻链。

本发明提供的抗 aPC 单克隆抗体 14（HAPC-14），其重链序列如 SEQ ID NO:5 所示，轻链序列如 SEQ ID NO:6 所示。

本发明还提供了针对人活化蛋白 C（aPC）的单克隆抗体（抗 aPC 单克隆抗体 14）的突变抗体。所述突变抗体在上述抗 aPC 单克隆抗体 14 的序列基础上经过设计、筛选和统计，发现以下包括如下 6 个位点的突变中的一个或多个突变会显著影响单克隆抗体 Fab 片段与捕获抗体的结合能力，亲和力高，功能活性高，来自种系序列的差异低。这六个位点分别是：

- a) 位于 VL CDR2 的 N57R/W (N57R 优于 N57W) ;
- b) 位于 VL CDR2 的 E59G/P (E59G 优于 E59P) ;
- c) 位于 VL CDR3 的 Q93V;
- d) 位于 VH CDR1 的 N31F;
- e) 位于 VH CDR2 的 S55K;
- f) 位于 VH CDR3 的 Y104T。

其中, 最关键的突变位点是轻链的 N57R 和重链的 N31F。在一些实施例中, 在人源化蛋白 C (haPC) 血友病小鼠模型中完全抑制 aPC 的抗凝活性, 且将凝血功能回复正常所需的抗 aPC 单克隆抗体的浓度低至 1 μ g/ml。

以下为描述方便, 采用简称的方式对各组合突变进行说明, 其中 N57R 是指位于 VL CDR2 的 N57R, N57W 是指位于 VL CDR2 的 N57W, E59G 是指位于 VL CDR2 的 E59G, E59P 是指位于 VL CDR2 的 E59P, Q93V 是指位于 VL CDR3 的 Q93V, N31F 是指位于 VH CDR1 的 N31F, S55K 是指位于 VH CDR2 的 S55K, Y104T 是指位于 VH CDR3 的 Y104T。

本发明中, 上述六个位点的突变组合包括但不限于: (1) 仅包含如下任一 一个位点的突变: N57R、N57W、E59G、E59P、Q93V、N31F 或 S55K; 或 (2) 同时包含如下两个位点的突变: N57R 和 N57W, E59G 和 E59P, Q93V 和 N31F, N31F 和 S55K, N57R 和 E59G, N57R 和 E59P, N57R 和 Q93V, N57R 和 N31F, N57R 和 S55K, N57W 和 E59P, N57W 和 Q93V, N57W 和 N31F, N57W 和 S55K, E59G 和 Q93V, E59G 和 N31F, E59G、S55K, E59P 和 N31F, E59P 和 S55K, Q93V 和 S55K; 或 (3) 同时包含如下三个位点的突变: N57R、N57W 和 E59G, N57R、N57W 和 E59P, N57R、N57W 和 Q93V, N57R、N57W 和 N31F, N57R、N57W 和 S55K, N57R、E59G 和 E59P, N57R、E59G 和 Q93V, N57R、E59G 和 N31F, N57R、E59G 和 S55K, N57R、E59P 和 Q93V, N57R、E59P 和 N31F, N57R、E59P 和 S55K, N57R、Q93V 和 N31F, N57R、Q93V 和 S55K, N57R、N31F 和 S55K, N57W、E59G、E59P, N57W、E59G、Q93V, N57W、E59G 和 N31F, N57W、E59G 和 S55K, N57W、E59P 和 Q93V, N57W、E59P 和 N31F, N57W、E59P 和 S55K, N57W、Q93V 和 N31F, N57W、Q93V 和 S55K, N57W、N31F 和 S55K, E59G、E59P 和 Q93V, E59G、E59P 和 N31F, E59G、E59P 和 S55K, E59G、Q93V 和 N31F, E59G、Q93V 和 S55K,

E59G、N31F 和 S55K, E59P、Q93V 和 N31F, E59P、Q93V 和 S55K, E59P、N31F 和 S55K, Q93V、N31F 和 S55K; 或 (4) 同时包含如下四个位点的突变: N57R、N57W、E59G 和 E59P, N57R、N57W、E59G 和 Q93V, N57R、N57W、E59G 和 N31F, N57R、N57W、E59G 和 S55K, N57R、E59G、E59P 和 Q93V, N57R、E59G、E59P 和 N31F, N57R、E59G、E59P 和 S55K, N57R、E59G、Q93V 和 N31F, N57R、E59G、Q93V 和 S55K, N57R、E59P、Q93V 和 N31F, N57R、E59P、Q93V 和 S55K, N57R、E59P、N31F 和 S55K, N57R、Q93V、N31F 和 S55K, N57W、E59G、E59P 和 Q93V, N57W、E59G、E59P 和 N31F, N57W、E59G、E59P 和 S55K, N57W、E59P、Q93V 和 N31F, N57W、E59P、Q93V 和 S55K, N57W、E59P、N31F 和 S55K, N57W、Q93V、N31F 和 S55K, E59G、E59P、Q93V 和 N31F, E59G、E59P、Q93V 和 S55K, E59G、Q93V、N31F 和 S55K, E59P、Q93V、N31F 和 S55K; 或 (5) 或同时包含如下五个位点的突变: N57R、N57W、E59G、E59P 和 Q93V, N57R、N57W、E59G、E59P 和 N31F, N57R、N57W、E59G、Q93V 和 N31F, N57R、N57W、E59P、Q93V 和 N31F, N57R、E59G、E59P、Q93V 和 N31F, N57W、E59G、E59P、Q93V 和 N31F, N57R、N57W、E59G、E59P 和 S55K, N57R、N57W、E59G、Q93V 和 S55K, N57R、N57W、E59P、Q93V 和 S55K, N57R、E59G、E59P、Q93V 和 S55K, N57W、E59G、E59P、Q93V 和 S55K, N57R、N57W、E59G、N31F 和 S55K, N57R、N57W、E59P、N31F 和 S55K, N57R、E59G、E59P、N31F 和 S55K, N57W、E59G、E59P、N31F 和 S55K, N57R、N57W、Q93V、N31F 和 S55K, N57R、E59G、Q93V、N31F 和 S55K, N57W、E59G、Q93V、N31F 和 S55K, N57R、E59P、Q93V、N31F 和 S55K, N57W、E59P、Q93V、N31F 和 S55K; 或 (6) 或同时包含如下六个位点的突变: N57R、N57W、E59G、E59P、Q93V 和 N31F, N57R、N57W、E59G、E59P、Q93V 和 S55K, N57R、N57W、E59G、E59P、N31F 和 S55K, N57R、N57W、E59G、Q93V、N31F 和 S55K, N57R、N57W、E59P、Q93V、N31F 和 S55K, N57R、E59G、E59P、Q93V、N31F 和 S55K, N57W、E59G、E59P、Q93V、N31F 和 S55K, N57R、E59G、E59P、Q93V、N31F 和 S55K, N57W、E59G、E59P、Q93V、N31F 和 S55K; 或 (7) 或同时包含如下七个位点的突变: N57R、N57W、E59G、E59P、Q93V、N31F、S55K。

在一具体实施方式中, 本发明提供了一种抗 aPC 单克隆抗体, 包含:

由 SEQ ID NO: 27 或 33 表示的重链 CDR1; 由 SEQ ID NO: 28 或 40 表示的重链

CDR2; 由 SEQ ID NO: 29 或 77 表示的重链 CDR3 中 CDR1、CDR2、CDR3 之一或两种或三种; 和/或,

由 SEQ ID NO:30 表示的轻链 CDR1; 由 SEQ ID NO: 31、37、43、49、73 任一序列表示的轻链 CDR2; 由 SEQ ID NO: 32 或 44 表示的轻链 CDR3 中 CDR1、CDR2、CDR3 之一或两种或三种。

在一具体实施方式中, 所述抗体选自以下:

包含 (a) 由 SEQ ID NO: 27、28 和 29 表示的重链 CDR; 和/或,

(b) 由 SEQ ID NO:30、31 和 32 表示的轻链 CDR 的抗体;

包含 (c) 由 SEQ ID NO: 33、34 和 35 表示的重链 CDR; 和/或,

(d) 由 SEQ ID NO:36、37 和 38 表示的轻链 CDR 的抗体;

包含 (e) 由 SEQ ID NO: 39、40 和 41 表示的重链 CDR; 和/或,

(f) 由 SEQ ID NO: 42、43 和 44 表示的轻链 CDR 的抗体;

包含 (g) 由 SEQ ID NO: 45、46 和 47 表示的重链 CDR; 和/或,

(h) 由 SEQ ID NO: 48、49 和 50 表示的轻链 CDR 的抗体;

包含 (i) 由 SEQ ID NO:51、52 和 53 表示的重链 CDR; 和/或,

(j) 由 SEQ ID NO: 54、55 和 56 表示的轻链 CDR 的抗体;

包含 (k) 由 SEQ ID NO: 57、58 和 59 表示的重链 CDR; 和/或,

(l) 由 SEQ ID NO: 60、61 和 62 表示的轻链 CDR 的抗体;

包含 (m) 由 SEQ ID NO: 63、64 和 65 表示的重链 CDR; 和/或,

(n) 由 SEQ ID NO: 66、67 和 68 表示的轻链 CDR 的抗体;

包含 (o) 由 SEQ ID NO: 69、70 和 71 表示的重链 CDR; 和/或,

(p) 由 SEQ ID NO: 72、73 和 74 表示的轻链 CDR 的抗体;

包含 (q) 由 SEQ ID NO: 75、76 和 77 表示的重链 CDR; 和/或,

(r) 由 SEQ ID NO: 78、79 和 80 表示的轻链 CDR 的抗体;

包含 (s) 由 SEQ ID NO: 81、82 和 83 表示的重链 CDR; 和/或,

(t) 由 SEQ ID NO: 84、85 和 86 表示的轻链 CDR 的抗体;

包含 (u) 由 SEQ ID NO: 87、88 和 89 表示的重链 CDR; 和/或,

(v) 由 SEQ ID NO: 90、91 和 92 表示的轻链 CDR。

本发明中, 所述抗 aPC 单克隆抗体的重链构架区可以是现有的任何适用于发

挥本发明所述抗 aPC 单克隆抗体功能的框架区，可以是人源或鼠源的。

本发明中，所述抗 aPC 单克隆抗体的轻链构架区可以是现有的任何适用于发挥本发明所述抗 aPC 单克隆抗体功能的框架区，可以是人源或鼠源的。

在一具体实施方式中，所述抗 aPC 单克隆抗体包含：

如 SEQ ID NO: 5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25 任一序列所示的重链序列；和/或，

如 SEQ ID NO: 6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26 任一序列所示的轻链序列。

在一具体实施方式中，所述抗 aPC 单克隆抗体选自以下：

包含如 SEQ ID NO:5 所示的重链序列，以及如 SEQ ID NO:6 所示的轻链序列的抗体 HaPC14；

包含如 SEQ ID NO:7 所示的重链序列，以及如 SEQ ID NO:8 所示的轻链序列的抗体 HaPC14-1；

包含如 SEQ ID NO:9 所示的重链序列，以及如 SEQ ID NO:10 所示的轻链序列的抗体 HaPC14-2；

包含如 SEQ ID NO:11 所示的重链序列，以及如 SEQ ID NO:12 所示的轻链序列的抗体 HaPC14-3；

包含如 SEQ ID NO:13 所示的重链序列，以及如 SEQ ID NO:14 所示的轻链序列的抗体 HaPC14-4；

包含如 SEQ ID NO:15 所示的重链序列，以及如 SEQ ID NO:16 所示的轻链序列的抗体 HaPC14-5；

包含如 SEQ ID NO:17 所示的重链序列，以及如 SEQ ID NO:18 所示的轻链序列的抗体 HaPC14-6；

包含如 SEQ ID NO:19 所示的重链序列，以及如 SEQ ID NO:20 所示的轻链序列的抗体 HaPC14-7。

包含如 SEQ ID NO:21 所示的重链序列，以及如 SEQ ID NO:22 所示的轻链序列的抗体 HaPC14-8。

包含如 SEQ ID NO:23 所示的重链序列，以及如 SEQ ID NO:24 所示的轻链序列的抗体 HaPC14-9。

包含如 SEQ ID NO:25 所示的重链序列,以及如 SEQ ID NO:26 所示的轻链序列的抗体 HaPC14-10。

本发明中,部分序列组成相同,但编号不同(具体可参见序列表中的具体氨基酸序列)。

例如表示抗体重链 CDR1 的序列:序列 27、87 相同;序列 33、39、45、51、57、63、69、75、81 相同。

表示抗体重链 CDR2 的序列:序列 28、34、52、70 相同;序列 40、46、58、64、76、82、88 相同。

表示抗体重链 CDR3 的序列:序列 29、35、41、47、53、59、65、71 相同;序列 77、83、89 相同。

表示抗体轻链 CDR1 的序列:序列 30、36、42、48、54、60、66、72、78、84、90 相同。

表示抗体轻链 CDR2 的序列:序列 37、61 相同;序列 49、55、67、79、85、91 相同。

表示抗体轻链 CDR3 的序列:序列 32、38、68、74、86 相同;序列 44、50、56、62、80、92 相同。

在一具体实施方式中,本发明还提供了所述抗 aPC 单克隆抗体相关的生物材料,为以下 1)至 10)中任意的一种或几种:

- 1) 编码如上所述的抗 aPC 单克隆抗体的核酸分子;
- 2) 含有 1)所述核酸分子的表达盒;
- 3) 含有 1)所述核酸分子的构建体;
- 4) 含有 2)所述表达盒的构建体;
- 5) 含有 1)所述核酸分子的表达系统;
- 6) 含有 2)所述表达盒的表达系统;
- 7) 含有 3)所述构建体的表达系统;
- 8) 含有 4)所述重组载体的表达系统;
- 9) 扩增编码如上所述的抗 aPC 单克隆抗体的氨基酸序列的核酸分子的引物对;

10) 含有根据如上所述的抗 aPC 单克隆抗体的融合抗体。其中，所述表达系统可以是细胞或细胞系，所述细胞或细胞系编码所述抗 aPC 单克隆抗体。

在一具体实施方式中，本发明提供一种制剂产品，所述制剂产品为药物组合物或检测试剂或检测试剂盒。

在一具体实施方式中，本发明提供的药物组合物，其含有根据如上所述的抗 aPC 单克隆抗体，或根据如上所述的生物材料之任意的一种或几种，以及药学可接受的载体。所述载体可以包括各种赋形剂和稀释剂，其本身并不是必要的活性成分，且施用后没有过分的毒性。合适的载体对于本领域技术人员来说应该是熟知的，例如，在 Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Pub.Co., N.J., 1991) 中记载了关于药学上可接受的载体的相关内容。

在一具体实施方式中，本发明提供的检测试剂或检测试剂盒，其含有根据如上所述的抗 aPC 单克隆抗体，或根据如上所述的生物材料之任意的一种或几种。其中，所述抗体是标记的。

其中，所述标记可以采用现有的任何方式进行，如采用化学发光标记、荧光团、放射性标记或生色团等。

其中，所述检测试剂或试剂盒还可以进一步包含缓冲剂、稀释剂、使用说明书等。

其中，所述抗体可以以适合其工作或发挥活性的任何形式存在，如以水性悬浮液形式存在。

在一些实施例中，本发明所述抗 aPC 单克隆抗体增强 aPC 裂解组蛋白 H3 和 H4 能力，预示抗 aPC 单克隆抗体可以提供针对组蛋白 H3 和 H4 细胞毒性的细胞保护作用。

在一具体实施方式中，本发明提供一种治疗凝血缺乏或缺陷病症的方法，所述凝血缺乏或缺陷病症定义如前所述，具体提供治疗遗传性与后天性凝血缺乏或缺陷例如 A 型血友病和 B 型血友病或败血病的方法；也提供通过将抗 aPC 单克隆抗体施用给有需要的患者（例如外伤患者，或需要血液凝固的患者）而缩短出血时间的方法；还提供抑制对象中的活化蛋白 C 抗凝活性的方法；还提供调节对象中的血栓形成的方法。本发明所述方法通过向有治疗需要的个体施用有效量的本发明上文所述的抗 aPC 单克隆抗体。也提供生产抗人 aPC 单克隆抗体的方法。

在一具体实施方式中，本发明提供一种治疗凝血缺乏或缺陷病症的方法，包括向有治疗需要的个体施用有效量的如上所述的抗 aPC 单克隆抗体或其相关生物材料。

在一具体实施方式中，本发明提供一种治疗凝血相关的方法，所述方法包括向有治疗有需要的个体施用有效量的根据如上所述的抗 aPC 单克隆抗体或根据如上所述的生物材料之任意的一种或几种；其中，所述个体患有凝血缺乏或缺陷病症，或所述个体需要血液凝固治疗，或所述个体患有败血病或血友病，或所述个体需要调制止血。

其中，所述凝血缺乏或缺陷病症可以是遗传性，也可以是后天性的，包括因血浆中某一种或某几种凝血因子缺乏造成凝血障碍并引起出血的病症；具体包括：A 型血友病、B 型血友病、C 型血友病——由缺乏凝血因子 VIII、IX 和 XI 而导致；罕见凝血因子缺乏症——由其它凝血因子（即凝血因子 I, II, V, V+VIII, VII, X, 或 XIII）中的一种或多种缺失或工作异常的出血性疾病等，例如创伤引起的凝血紊乱，治疗败血症、移植、心脏手术、整形外科手术引起的过度出血等。

在一具体实施方式中，本发明提供的增强 aPC 裂解组蛋白 H3 和 H4 能力的方法，施用所述抗 aPC 单克隆抗体或其相关生物材料或药物组合物后，能够增强 aPC 裂解组蛋白 H3 和 H4 能力，进而可以提供针对组蛋白 H3 和 H4 细胞毒性的细胞保护作用。

在一具体实施方式中，本发明提供的抑制个体中的活化蛋白 C 抗凝活性的方法，施用所述抗 aPC 单克隆抗体或其相关生物材料或药物组合物后，能够抑制个体中的活化蛋白 C 抗凝活性，进而调节个体的凝血功能。

在一具体实施方式中，本发明提供所述抗 aPC 单克隆抗体或其相关生物材料

- i) 在制备预防和/或治疗凝血缺乏或缺陷病症的药物中的应用；
- ii) 在制备增强 aPC 裂解组蛋白 H3 和 H4 能力的促进剂中的应用；
- iii) 在制备抑制个体中的活化蛋白 C 抗凝活性的药物中的应用；
- iv) 在制备治疗需要血液凝固的个体的药物中的应用；
- vi) 在制备调节个体止血的药物中的应用；

vii) 在疾病或非疾病诊断治疗目的的免疫学检查分析或在制备 aPC 的检测试剂或试剂盒中的应用；

viii) 在与其他试剂或药物联合使用中的应用。

在一具体实施方式中，本发明还提供了一种如上所述抗 aPC 单克隆抗体的制备方法，所述方法包括如下步骤：在适合表达所述抗 aPC 单克隆抗体的条件下，培养所述抗 aPC 单克隆抗体的表达系统，从而表达出所述抗 aPC 单克隆抗体。

本发明中，与所述抗 aPC 单克隆抗体的氨基酸序列具有一定同一性的多肽也在本发明的保护范围内。如与所述抗 aPC 单克隆抗体具有 70%、75%、80%、85%、90%、95%、99% 以上序列同一性且具有所述抗 aPC 单克隆抗体功能的抗体或抗体片段（具有 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 以上的序列同一性）。具体地，对所述抗 aPC 单克隆抗体经过取代、缺失或者添加一个或多个（具体可以是 1-50、1-30 个、1-20 个、1-10 个、1-5 个、1-3 个、1 个、2 个、或 3 个）氨基酸得到的，或者在 N-末端和/或 C-末端添加一个或多个（具体可以是 1-50 个、1-30 个、1-20 个、1-10 个、1-5 个、1-3 个、1 个、2 个、或 3 个）氨基酸得到的，且具有所述抗 aPC 单克隆抗体功能的多肽片段。

术语“蛋白 C”或“PC”是指呈其酶原形式的蛋白 C 的任一变体、同种型和/或物种同系物，其被细胞天然地表达并存在于血浆中，且与蛋白 C 的活化形式不同。

术语“活化蛋白 C”或“aPC”指活化形式的蛋白 C。

术语“抗 aPC 单克隆抗体”指特异地结合至 aPC 的表位的抗体，为抗人 aPC 单克隆抗体。所述抗 aPC 单克隆抗体可以是多种抗体形式，包括但不限于完全抗体、抗体片段、人抗体、人源化抗体和遗传改造抗体，如单克隆抗体、嵌合抗体或重组抗体、以及这些抗体的片段，条件是其保持按照本发明的性质。

其中，所述抗体片段进一步定义为 Fab'、Fab、F(ab')₂、单结构域抗体、Fv 或 scFv 等。本文所述抗 aPC 单克隆抗体指单一分子组分的抗体分子制剂。单克隆抗体组分对特定表位表现单一结合特异性以及亲和力，其可以具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区、恒定区。例如，Fab 片段是指由 VL、VH、CL 与 CH1 结构域组成的单价片段；F(ab')₂ 片段是指包含在铰链区由二硫桥连接的两个 Fab 片段的二价片段；Fv 片段是指由抗体单臂的 VL 与 VH 结构域组成的 Fv 片段。

术语“同一性”可以用肉眼或计算机软件进行评价。使用计算机软件，两个或多个序列之间的同一性可以用百分比(%)表示，其可以用来评价相关序列之间

的同一性。

术语“个体”通常包括人类、非人类的灵长类，如哺乳动物、狗、猫、马、羊、猪、牛等，其可因利用上述的抗体、药物、组合物、相关制剂、试剂盒或联合制剂进行治疗而获益。

术语“治疗有效量”通常指一用量在经过适当的给药期间后，能够达到治疗如上所列出的疾病的效果。

术语“单克隆抗体”指单一氨基酸组合物的抗体分子制剂。其可以具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。在一个实施方案中，所述单克隆抗体由杂交瘤制备，所述杂交瘤包括 B 细胞，其由具有包含与无限增殖化细胞融合的人重链转基因和人轻链转基因的基因组的转基因非人动物、例如转基因小鼠获得。

术语“融合抗体”是指是指利用基因工程技术将抗体片段与其他生物活性蛋白融合所得的产物；在基因水平将目的基因同 Ig 部分片段基因相连，并在真核或原核细胞中表达出的具有上述两部分结构域的重组蛋白。据目的蛋白与 Ig 不同片断相连，可将其分为两大类：一类为 Fab(Fv)融合蛋白；另一类为 Fc 融合蛋白。两个不同的蛋白质连成一个大分子。可以通过化学方法连接，也可通过基因的融合来实现。制备融合抗体的方法涉及本领域中公知的常规重组 DNA 和基因转染技术。由于融合蛋白的不同，这种抗体融合蛋白具有多种生物学功能，并且表达的重组蛋白既不影响单链抗体的抗原结合能力，也不影响与之融合的蛋白质的生物学特性。

术语“人源化抗体”指其中构架区或“互补决定区”(CDR)已被改进为包括与亲本免疫球蛋白相比具有不同特异性的免疫球蛋白的 CDR。

提及抑制和/或阻断 aPC 底物结合至 aPC 时，术语抑制与阻断也包括，当与抗-aPC 抗体接触时，aPC 对生理底物的结合亲和力与 aPC 不与抗-aPC 抗体接触时相比可测量的降低，例如，阻断 aPC 与其底物包括因子 Va 或与因子 VIIIa 相互作用至少约 10%、约 20%、约 30%、约 40%、约 50%、约 60%、约 70%、约 80%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或约 100%。

“互补决定区”或“CDR”意指抗体分子的重链可变区或轻链可变区内三个高变区中的一个，其形成与被结合抗原的三维结构互补的 N 端抗原-结合面。从

重链或轻链的 N 端开始，这些互补决定区分别表示为“CDR1”、“CDR2”以及“CDR3”。CDR 涉及抗原-抗体结合，且 CDR3 包含对抗原-抗体结合具有特异性的独特区域。因此，抗原-结合位点可包括六个 CDR，其包含来自重链与轻链 V 区的每一个的 CDR 区。

术语“表位”意指抗体特异地结合或相互作用的抗原的范围或区域，其在一些实施方式中指示抗原在物理上与抗体接触之处。

术语“保守性置换”意指多肽修饰，其涉及将一或多个氨基酸置换成具有相似生物化学特性但不造成多肽的生物或生物化学功能丧失的氨基酸。“保守性氨基酸置换”是其中将氨基酸残基以具有相似侧链的氨基酸残基取代。具有相似侧链的氨基酸残基家族在本领域中已经定义。常见的保守性置换例如是芳香族氨基酸 Phe、Trp、Tyr 之间的相互置换；疏水性氨基酸 Leu、Ile、Val 之间的相互置换，极性氨基酸 Gln、Asn 之间的相互置换，碱性氨基酸 Lys、Arg、His 之间的相互置换，酸性氨基酸 Asp、Glu 之间的相互置换，羟基的氨基酸 Ser、Thr 之间的相互置换。

术语“同一性”表示两个核酸或两个多肽比较时核苷酸相同的比例，如在至少约 80%的核苷酸或氨基酸，通常至少约 85%，在一些实施方式中约 90%、91%、92%、93%、94%或 95%，在至少一个实施方式中至少约 96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%或 99.5%的核苷酸或氨基酸中是相同的。

核酸可存在于整个细胞中、在细胞裂解物中、或呈部分纯化或实质上纯的形式。当从在天然环境中与核酸通常缔合的其它细胞组分纯化出来时，核酸是“分离的”或“使其实质上纯的”。可使用本领域熟知技术分离核酸，诸如碱/SDS 处理、CsCl 成带、柱层析、琼脂糖凝胶电泳等。

本发明所采用的相关术语，解释如下：

CDRs	Complementary-determining regions
CV	Column volume
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Fab	Antigen binding fragment
hr	Hour
HRP	Horseradis peroxydase

KDa	Kilodaltons
koff	Dissociation Rate
OD	Optical density
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Periplasmic extract
SA	Streptavidin
scFv	Single chain variable fragment
SPR	Surface plasmon resonance
TMB	Tetra-methyl-benzidine
VH	Heavy chain variable domain
VL	Light chain variable domain

下面结合实施例进一步阐述本发明。这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。实施本发明的过程、条件、实验方法等，除以下专门提及的内容之外，均为本领域的普遍知识和公知常识，本发明没有特别限制内容。

实施例 1 小鼠抗 aPC 单克隆抗体人源化

对小鼠杂交瘤抗体可变区序列进行人源化设计。VH / VL 氨基酸序列用 Kabat 系统编注。其次，分析 VH / VL 序列是否存在 hot spot 位点，其中包括未配对的半胱氨酸残基、N-糖基化位点和 CDR 内部的脱氨基位点，靠近 CDR 的 N-糖基化位点也将被视为高风险位点。如果识别出这样的位点，则需要将此类位点移除。基于对 VH / VL 序列比对，选择最佳的人种系基因的框架序列，且基于最佳同源性选择 J 区序列进行拼接。对鼠源 VH/VL 序列进行同源建模形成 3D 结构。与 CDR 在 5Å 距离内的 FR 残基、VH/VL 结合面上改变后对于抗原结合有影响的残基等将被认为是潜在需要做回复突变的位点。并通过计算机分析确定回复突变的重要性，设计一种含有单个或数个回复突变的不同组合。

通过 PCR 扩增靶区段 DNA，构建编码人源化抗体序列的质粒。通过瞬时转染与表达，并通过 protein A 亲和层析柱纯化抗体。通过 SEC-HPLC 和 SDS-PAGE

法分析鉴定人源化抗体，得到 28 个人源化抗 aPC 单克隆抗体克隆。

1.1 ELISA 法测定抗 aPC 单克隆抗体与人 aPC 蛋白（haPC）亲和力

通过 ELISA 和 FACS 测定和比较嵌合抗体和上述 28 个人源化抗体与 haPC 的亲和力。

测定结果如图 1 所示，第 1-28 号（Humab001-1~1-28 或 HAPC-1~ HAPC28）人源化抗体、3657 阳性对照抗体（3657 PC mAb）、嵌合抗体（30120-mAb001× hIgG）均与 haPC 有较好的结合。其中第 13-20 号抗体 EC50 值较低，说明这些抗体与 haPC 结合力更强。

1.2 ELISA 法测定抗 aPC 单克隆抗体与人 PC 蛋白（hPC）的结合力

选取 13-20 号人源化抗 aPC 单克隆抗体（Humab001-13~ Humab001-20 或 HAPC-13~ HAPC-20），测定其与 hPC 结合力。

结果如图 2 所示，结果表明，第 13-20 号人源化抗 aPC 单克隆抗体与 hPC 无任何结合。

其中，13 号抗体(HAPC-13)、14 号抗体(HAPC-14)和 16 号抗体(HAPC-16)是拟进行亲和力优化时选取的三个亲本抗体。这三个抗体重链的框架区是一样的，轻链的框架区有区别，其中 HAPC-13 是原始的，HAPC-14 在 HAPC-13 基础上有 1 个回复突变，HAPC-16 在 HAPC-13 基础上有 5 个回复突变。以下实施例选取 HAPC-14 抗体进行后续的亲和力优化。

实施例 2 抗 aPC 单克隆抗体 HAPC-14 亲和力优化

在前述第 14 号抗体（Humab001-14 或 HAPC14 或 HAPC-14）的基础上进行抗体亲和力优化设计和突变体构建。

Materials	Vendor/ Generator	Catalog No.
Blocker Casein in PBS	Pierce	37528
SA-HRP	Sigma	S5512
Goat Anti-Human IgG Fd	Southern Biotech	2046-01
Goat anti-Human IgG F(ab')2-HRP	Jackson	109-035-006
Goat anti-c-myc HRP conjugated	BETHYL	A190-104P
Blocker Casein in PBS	Pierce	37528
SA-HRP	Sigma	S5512
Expi293F™ Cells	Thermo Fisher	A14527
ExpiFectamine293 transfection kit	Thermo Fisher	A14524

Expi293F™ expression medium	Thermo Fisher	A1435101
Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent	Thermo Fisher	11668019
Fetal bovine serum (FBS)	Corning	35-076-CV
Opti-MEM	Thermo Fisher	31985070
MabSelect SuRe column	GE healthcare	11-0034-93
NuPAGE4%-12% Bis-Tris Gel	Thermo Fisher	NP0322BOX
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Thermo Fisher	26614
HPLC-SEC column	TOSOH	08541
Series S Sensor Chip CM5	GE healthcare	29-1496-03
Amine Coupling Kit	GE healthcare	BR100633
10×HBS-EP+ buffer	GE healthcare	BR100669
anti-human Fc IgG	Jackson	109-005-098
10 mM Glycine, pH 1.5	Cool pharm	KH-59224

2.1 定点突变

使用定点突变方法将亲本 HAPC-14 Fab 克隆的六个互补决定区（CDR）的每个氨基酸分别突变为其他 19 个氨基酸。含有编码 20 个氨基酸的 NNS 密码子的 DNA 引物用于将突变引入每个目标 CDR 位置。磷酸化的简并引物用于定点诱变反应。

2.2 PCR 反应

PCR 条件为：94℃ 2 分钟（94℃30 秒，55℃30 秒，72℃ 5 分钟），16 个循环，72℃10 分钟。

纯化 PCR 产物，然后电穿孔到大肠杆菌 TG1 中以用于菌落形成和 Fab 片段的产生。

2.3 初级 Fab 突变体文库筛选

初步筛选包括单点 ELISA（SPE）分析，该分析是通过捕获 ELISA 进行的。

涉及在 4℃ pH 7.4 的包被缓冲液 PBS 中用抗 Fab 抗体包被 96 孔板各个孔。第二天，在 25℃下用 pH7.4 的 PBS 中的酪蛋白封闭板 1 小时。然后将 Fab PE 添加到板上，并在 25℃下孵育 1 小时。洗涤后，将生物素化的抗原加入孔中，以在 25℃孵育 1 小时。随后在 25℃下与 SA 辣根过氧化物酶（HRP）偶联物孵育 1 小时。用四甲基联苯胺（TMB）底物检测 HRP 活性，并用 2M HCl 淬灭反应。在 450nm 下读取板。挑选出在 450nm 处表现出大于亲本克隆 3 倍的光密度（OD）信号的克隆并进行测序。通过在 pH 7.4 的捕获 ELISA 证实具有独特序列的 HAPC-14 的结合改良突变体。通过直接抗原包被 ELISA 对具有 HAPC-14 独特序

列的结合改良突变体进行排序。如下表 1 所示。

表 1

Antibody	Mutation	Capture Elisa OD450	Bmax	EC50
HAPC-14-Fab	WT	~0.6196	0.221	221.3
HAPC-14-R1-1H1-F2	N to F	2.5193	0.2776	20.33
HAPC-14-R1-2H6-C2	S to K	1.8358	0.2621	19.42
HAPC-14-R1-3H4-C5	Y to S	1.77415	0.3275	102.80
HAPC-14-R1-3H4-C6	Y to T	1.4995	0.3245	55.82
HAPC-14-R1-3H7-F2	Y to P	1.42405	0.1933	25.13
HAPC-14-R1-1L7-B9	D to A	1.34885	0.1509	28.41
HAPC-14-R1-2L4-A1	N to L	2.1465	0.2441	13.38
HAPC-14-R1-2L4-B2	N to W	2.99075	0.6618	4.82
HAPC-14-R1-2L4-D4	N to R	3.0343	0.5669	10.45
HAPC-14-R1-2L4-G9	N to K	2.3219	0.2868	13.19
HAPC-14-R1-2L6-G1	E to G	2.00495	0.4919	35.65
HAPC-14-R1-2L6-F2	E to K	1.37175	0.2995	28.24
HAPC-14-R1-2L6-G11	E to P	1.56065	0.2199	18.04
HAPC-14-R1-3L1-D11	Q to W	2.06855	0.2612	13.64
HAPC-14-R1-3L1-G8	Q to V	1.4895	0.2405	30.79

如表 1 所示，在 HAPC-14 的初次筛选中鉴定出的九种个体（HAPC-14-R1-1H1-F2、HAPC-14-R1-2H6-C2、HAPC-14-R1-3H4-C6、HAPC-14-R1-2L4-B2、HAPC-14-R1-2L4-D4、HAPC-14-R1-2L6-G1、HAPC-14-R1-2L6-G11、HAPC-14-R1-3L1-D11、HAPC-14-R1-3L1-G8）亲和力改善的突变，进一步用于设计和构建组合突变体文库。

2.4 通过直接 KD 排序 ELISA 验证主要 Fab 突变体文库

通过直接抗原包被 ELISA 的 KD ELISA 确定每个突变体的结合改善的 Fab 的 KD 等级。

在 pH 7.4 的 1xPBS 缓冲液中用 hPro1.biotin 包被 96 孔板各个孔，并在 4℃ 孵育过夜。第二天，在 25℃ pH7.4 的 1xPBS 缓冲液中用酪蛋白封闭板 1 小时。将按一种浓度稀释的每种突变体的 Fab PE 加入平板中，然后在 25℃ 孵育 1 小时。随后与在 25℃ 偶联 1 小时的山羊抗 c-myc HRP 孵育。用四甲基联苯胺（TMB）底物检测 HRP 活性，并用 2M HCl 淬灭反应。在 450nm 下读取各板的 OD 值。

2.5 HAPC-14 Fab 文库的组合筛选

确定对结合抗原有益的 VH 和 VL 中的点突变被进一步组合以获得额外的结合协同作用。简而言之，每个简并引物都被磷酸化，然后与尿嘧啶化的 ssDNA 以 10: 1 的比例使用。将混合物加热至 85°C 5 分钟，然后冷却至 55°C 1 小时以上。之后，加入 T4 连接酶和 T4 DNA 聚合酶，并将混合物在 37°C 温育 1.5 小时。将 100 ng 的组合文库 DNA 电穿孔到 TG1 中，以形成菌落和生产 Fab 片段。

将组合突变体表达为 Fab，并使用捕获 ELISA 进行筛选。对在 450nm 处表现出大于第一轮先导克隆 3 倍光密度 (OD) 信号的克隆进行测序。通过捕获 ELISA 进一步证实具有独特序列的结合改良突变体，并通过直接抗原包被 ELISA 进行排序。

筛选了 HAPC-14 的多个组合突变体，并通过 KD ELISA 确认了前 16 个亲和力具有显著改善的组合突变体（见表 2 中 No.1-16）。

表 2

		Capture Elisa	KD Elisa ranking			VHCDR1	VHCDR2	VHCDR3	VLCDR2	VLCDR3
No.	Name	OD450	Bmax	EC50	NYL	NYLN	DIRLKSNNYKHYAESVKG	EGDYFDY	LASNLES	QQNNEDPYT
	HAPC-14	0.0758	/	/						
1	R2-24F3	2.7928	1.366	1.373	F...	... K ...	...	... W. G.	V...	
2	R2-23H2	2.6867	1.26	1.934	F...	... K ...	...	... W. G.	...	
3	R2-25G5	2.6576	1.045	5.659	F...	... K ...	...	... W. P.	V...	
4	R2-26E4	2.5923	1.211	1.838	F...	... K ...	...	... R. G.	V...	
5	R2-25B7	2.5891	1.067	2.724	F...	...	...	... W. P.	V...	
6	R2-27G7	2.58	0.7152	1.004	F...	... K ...	...	... R. G.	...	
7	R2-29D9	2.5494	0.9603	7.854	F...	... K ...	... T ...	... R. P.	V...	
8	R2-24H1	2.4255	1.251	2.517	F...	...	...	... R. G.	V...	
9	R2-22A10	2.3922	1.015	2.679	F...	... K ...	...	... R. ...	V...	
10	R2-24D4	2.373	0.7169	2.104	F...	... K ...	... T ...	... W. P.	...	
11	R2-30F7	2.3418	0.6171	7.274	F...	...	...	... R. P.	V...	
12	R2-23E10	2.3192	1.235	1.299	F...	...	...	... W. G.	...	
13	R2-22B1	2.3056	1.225	1.194	F...	... K ...	... T ...	... W. P.	V...	
14	R2-32E6	2.1754	1.41	3.879	...	... K ...	...	... W. G.	V...	
15	R2-22B6	2.1719	1.214	3.971	F...	...	...	... R. G.	...	
16	R2-9C1	1.9471	1.089	1.8	F...	... K ...	...	... W. ...	V...	

经过筛选和统计，发现以下 6 个位点的突变会显著影响 Fab 片段与捕获抗体的结合能力，这六个位点分别是：

a) 位于 VL CDR2 的 N57R/W (N57R 优于 N57W)

- b) 位于 VL CDR2 的 E59G/P (E59G 优于 E59P) ;
- c) 位于 VL CDR3 的 Q93V;
- d) 位于 VH CDR1 的 N31F;
- e) 位于 VH CDR2 的 S55K;
- f) 位于 VH CDR3 的 Y104T;

其中最关键的突变位点是位于轻链的 N57R 和位于重链的 N31F。

实施例3 对 HAPC-14 组合突变位点的抗 aPC 单克隆抗体(构建整个 IgG1)

3.1 对 HAPC14 组合突变位点构建抗 aPC 单克隆抗体 (HAPC14-1~HAPC14-10)

基于实施例 2 的 6 个突变位点,进行了组合构建,得到 10 个突变体(如下表 3 中 14-1~14-10)(HAPC14-1~HAPC14-10),而后将序列构建完整的 IgG 形式进行表达纯化,考察其抗体表达量、亲和力以及其他生物活性情况。

HAPC-14 和 10 个突变体的氨基酸序列如 SEQ ID NO.5~26 所示。

人源化抗体 13 (HAPC-13)

重链 (SEQ ID NO. 1)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYLNWVRQAPGKGLEWVGDIRLKSNNYEKHYAESVKGRFTISRDDSKSITYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGDFDYWGQGTITVTVSS

轻链 (SEQ ID NO. 2)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASESVDSFGATFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQNNEDPYTFGQGTKLEIK

人源化抗体 16 (HAPC-16)

重链 (SEQ ID NO. 3)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYLNWVRQAPGKGLEWVGDIRLKSNNYEKHYAESVKGRFTISRDDSKSITYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGDFDYWGQGTITVTVSS

轻链 (SEQ ID NO. 4)

NIVLTQSPSSLSASVGRVTITCRASESVDSFGATFMHWYQQKPGKPPKLLIYLASNLESGVPSRFSGSGSRTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQNNEDPYTFGQGTKLEIK

人源化抗体 14 (HAPC-14)

重链 (SEQ ID NO. 5)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSNYYLNWVRQAPKGLEWVGDIRLKSNNYEKHYAESVKGRFTISRDDSKSITYLQMNSLRAED
TAVYYCAREGDYFDYWGQGTITVTVSS

轻链 (SEQ ID NO. 6)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDSFGATFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
QQNNEDPYTFGQGTKLEIK

HAPC-14-1

重链 (SEQ ID NO. 7)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFYFLNWVRQAPKGLEWVGDIRLKSNNYEKHYAESVKGRFTISRDDSKSITYLQMNSLRAED
TAVYYCAREGDYFDYWGQGTITVTVSS

轻链 (SEQ ID NO. 8)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDSFGATFMHWYQQKPGKAPKLLIYASWLGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
QQNNEDPYTFGQGTKLEIK

HAPC-14-2

重链 (SEQ ID NO. 9)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFYFLNWVRQAPKGLEWVGDIRLKSNNYEKHYAESVKGRFTISRDDSKSITYLQMNSLRAED
TAVYYCAREGDYFDYWGQGTITVTVSS

轻链 (SEQ ID NO. 10)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDSFGATFMHWYQQKPGKAPKLLIYASWLGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
VQNNEDPYTFGQGTKLEIK

HAPC-14-3

重链 (SEQ ID NO. 11)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFYFLNWVRQAPKGLEWVGDIRLKSNNYEKHYAESVKGRFTISRDDSKSITYLQMNSLRAED
TAVYYCAREGDYFDYWGQGTITVTVSS

轻链 (SEQ ID NO. 12)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDSFGATFMHWYQQKPGKAPKLLIYASRLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
VQNNEDPYTFGQGTKLEIK

HAPC-14-4

重链 (SEQ ID NO. 13)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFYFLNWVRQAPGKGLEWVGDIRLKSNNYEKHYAESVKGRFTISRDDSKSITYLQMNSLRAED
TAVYYCAREGDYFDYWGGTTVTVSS

轻链 (SEQ ID NO. 14)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASEVDSFGATFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASRLGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
VQNNEDPYTFGGGTKLEIK

HAPC-14-5

重链 (SEQ ID NO. 15)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFYFLNWVRQAPGKGLEWVGDIRLKSNNYEKHYAESVKGRFTISRDDSKSITYLQMNSLRAED
TAVYYCAREGDYFDYWGGTTVTVSS

轻链 (SEQ ID NO. 16)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASEVDSFGATFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASRLGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
VQNNEDPYTFGGGTKLEIK

HAPC-14-6

重链 (SEQ ID NO. 17)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFYFLNWVRQAPGKGLEWVGDIRLKSNNYEKHYAESVKGRFTISRDDSKSITYLQMNSLRAED
TAVYYCAREGDYFDYWGGTTVTVSS

轻链 (SEQ ID NO. 18)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASEVDSFGATFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASRLGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
QQNNEDPYTFGGGTKLEIK

HAPC-14-7

重链 (SEQ ID NO. 19)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFYFLNWVRQAPGKGLEWVGDIRLKSNNYEKHYAESVKGRFTISRDDSKSITYLQMNSLRAED
TAVYYCAREGDYFDYWGGTTVTVSS

轻链 (SEQ ID NO. 20)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASEVDSFGATFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASRLGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
QQNNEDPYTFGGGTKLEIK

HAPC-14-8

重链 (SEQ ID NO. 21)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFYFLNWVRQAPGKGLEWVGDIRLKSNNYEKHYAESVKGRFTISRDDSKSITYLQMNSLRAED
TAVYYCAREGDTFDYWGGTTVTVSS

轻链 (SEQ ID NO. 22)

DIQLTQSPSSLASVGDRTITCRASESVDSFGATFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASRLGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
VQNNEDPYTFGQGTKLEIK

HAPC-14-9

重链 (SEQ ID NO. 23)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFYFLNWVRQAPGKGLEWVGDIRLKNNYEKHYAESVKGRFTISRDDSKSITYLQMNSLRAED
TAVYYCAREGDTFDYWGQGTITVTVSS

轻链 (SEQ ID NO. 24)

DIQLTQSPSSLASVGDRTITCRASESVDSFGATFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASRLGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
VQNNEDPYTFGQGTKLEIK

HAPC-14-10

重链 (SEQ ID NO. 25)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYFLNWVRQAPGKGLEWVGDIRLKNNYEKHYAESVKGRFTISRDDSKSITYLQMNSLRAED
TAVYYCAREGDTFDYWGQGTITVTVSS

轻链 (SEQ ID NO. 26)

DIQLTQSPSSLASVGDRTITCRASESVDSFGATFMHWYQQKPGKAPKLLIYLASRLGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
VQNNEDPYTFGQGTKLEIK

HAPC-14

重链 CDR1 (SEQ ID NO. 27)

NYFLN

HAPC-14

重链 CDR2 (SEQ ID NO. 28)

DIRLKSNNYEKHYAESVKG

HAPC-14

重链 CDR3 (SEQ ID NO. 29)

EGDYFDY

HAPC-14

轻链 CDR1 (SEQ ID NO. 30)

RASESVDSFGATFMH

HAPC-14

轻链 CDR2 (SEQ ID NO. 31)

LASNLES

HAPC-14

轻链 CDR3 (SEQ ID NO. 32)

QQNNEDPYT

HAPC-14-1

重链 CDR1 (SEQ ID NO. 33)

FYYLN

HAPC-14-1

重链 CDR2 (SEQ ID NO. 34)

DIRLKSNNYEKHYAESVKG

HAPC-14-1

重链 CDR3 (SEQ ID NO. 35)

EGDYFDY

HAPC-14-1

轻链 CDR1 (SEQ ID NO. 36)

RASESVDSFGATFMH

HAPC-14-1

轻链 CDR2 (SEQ ID NO. 37)

LASWLGS

HAPC-14-1

轻链 CDR3 (SEQ ID NO. 38)

QQNNEDPYT

HAPC-14-2

重链 CDR1 (SEQ ID NO. 39)

FYYLN

HAPC-14-2 (SEQ ID NO. 40)

重链 CDR2

DIRLKKNNYEKHYAESVKG

HAPC-14-2

重链 CDR3 (SEQ ID NO. 41)

EGDYFDY

HAPC-14-2

轻链 CDR1 (SEQ ID NO. 42)

RASESVDSFGATFMH

HAPC-14-2

轻链 CDR2 (SEQ ID NO. 43)

LASWLES

HAPC-14-2

轻链 CDR3 (SEQ ID NO. 44)

VQNNEDPYT

HAPC-14-3

重链 CDR1 (SEQ ID NO. 45)

FYYLN

HAPC-14-3

重链 CDR2 (SEQ ID NO. 46)

DIRLKKNNYEKHYAESVKG

HAPC-14-3

重链 CDR3 (SEQ ID NO. 47)

EGDYFDY

HAPC-14-3

轻链 CDR1 (SEQ ID NO. 48)

RASESVDSFGATFMH

HAPC-14-3

轻链 CDR2 (SEQ ID NO. 49)

LASRLGS

HAPC-14-3

轻链 CDR3 (SEQ ID NO. 50)

VQNNEDPYT

HAPC-14-4

重链 CDR1 (SEQ ID NO. 51)

FYYLN

HAPC-14-4

重链 CDR2 (SEQ ID NO. 52)

DIRLKSNNYEKHYAESVKG

HAPC-14-4

重链 CDR3 (SEQ ID NO. 53)

EGDYFDY

HAPC-14-4

轻链 CDR1 (SEQ ID NO. 54)

RASESVDSFGATFMH

HAPC-14-4

轻链 CDR2 (SEQ ID NO. 55)

LASRLGS

HAPC-14-4

轻链 CDR3 (SEQ ID NO. 56)

VQNNEDPYT

HAPC-14-5

重链 CDR1 (SEQ ID NO. 57)

FYYLN

HAPC-14-5

重链 CDR2 (SEQ ID NO. 58)

DIRLKKNNYEKHYAESVKG

HAPC-14-5

重链 CDR3 (SEQ ID NO. 59)

EGDYFDY

HAPC-14-5

轻链 CDR1 (SEQ ID NO. 60)

RASESVDSFGATFMH

HAPC-14-5

轻链 CDR2 (SEQ ID NO. 61)

LASWLGS

HAPC-14-5

轻链 CDR3 (SEQ ID NO. 62)

VQNNEDPYT

HAPC-14-6

重链 CDR1 (SEQ ID NO. 63)

FYYLN

HAPC-14-6

重链 CDR2 (SEQ ID NO. 64)

DIRLKKNNYEKHYAESVKG

HAPC-14-6

重链 CDR3 (SEQ ID NO. 65)

EGDYFDY

HAPC-14-6

轻链 CDR1 (SEQ ID NO. 66)

RASESVDSFGATFMH

HAPC-14-6

轻链 CDR2 (SEQ ID NO. 67)

LASRLGS

HAPC-14-6

轻链 CDR3 (SEQ ID NO. 68)

QQNNEDPYT

HAPC-14-7

重链 CDR1 (SEQ ID NO. 69)

FYYLN

HAPC-14-7

重链 CDR2 (SEQ ID NO. 70)

DIRLKSNNYEKHYAESVKG

HAPC-14-7

重链 CDR3 (SEQ ID NO. 71)

EGDYFDY

HAPC-14-7

轻链 CDR1 (SEQ ID NO. 72)

RASESVDSFGATFMH

HAPC-14-7

轻链 CDR2 (SEQ ID NO. 73)

LASRLES

HAPC-14-7

轻链 CDR3 (SEQ ID NO. 74)

QQNNEDPYT

HAPC-14-8

重链 CDR1 (SEQ ID NO. 75)

FYYLN

HAPC-14-8

重链 CDR2 (SEQ ID NO. 76)

DIRLKKNNYEKHYAESVKG

HAPC-14-8

重链 CDR3 (SEQ ID NO. 77)

EGDTFDY

HAPC-14-8

轻链 CDR1 (SEQ ID NO. 78)

RASESVDSFGATFMH

HAPC-14-8

轻链 CDR2 (SEQ ID NO. 79)

LASRLGS

HAPC-14-8

轻链 CDR3 (SEQ ID NO. 80)

VQNNEDPYT

HAPC-14-9

重链 CDR1 (SEQ ID NO. 81)

FYYLN

HAPC-14-9

重链 CDR2 (SEQ ID NO. 82)

DIRLKKNNYEKHYAESVKG

HAPC-14-9

重链 CDR3 (SEQ ID NO. 83)

EGDTFDY

HAPC-14-9

轻链 CDR1 (SEQ ID NO. 84)

RASESVDSFGATFMH

HAPC-14-9

轻链 CDR2 (SEQ ID NO. 85)

LASRLGS

HAPC-14-9

轻链 CDR3 (SEQ ID NO. 86)

QQNNEDPYT

HAPC-14-10

重链 CDR1 (SEQ ID NO. 87)

NYYLN

HAPC-14-10

重链 CDR2 (SEQ ID NO. 88)

DIRLKKNNYEKHYAESVKG

HAPC-14-10

重链 CDR3 (SEQ ID NO. 89)

EGDTFDY

HAPC-14-10

轻链 CDR1 (SEQ ID NO. 90)

RASESVDSFGATFMH

HAPC-14-10

轻链 CDR2 (SEQ ID NO. 91)

LASRLGS

HAPC-14-10

轻链 CDR3 (SEQ ID NO. 92)

VQNNEDPYT

详细信息见表 3。

表 3

Backbone hIgG1			
Entry	Mutations	H chain	L chain
1	L57W,L59G,H31F	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFYFLNW VRQAPGKGLEWVGDIRLKNNYEKHYAESVKGRFTI SRDDSKSITYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGDYFDYN GQGTTVTVSS	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITTCRASESVDSEFGATFMHNYQQKPGKA FKLLIVLASWLGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ NNEDPYTFGQGTKLEIK
2	L57W,L93V,H31F,H55K	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFYFLNW VRQAPGKGLEWVGDIRLKNNYEKHYAESVKGRFTI SRDDSKSITYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGDYFDYN GQGTTVTVSS	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITTCRASESVDSEFGATFMHNYQQKPGKA FKLLIVLASWLGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCVQ NNEDPYTFGQGTKLEIK
3	L57R,L59G,L93V,H31F,H55K	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFYFLNW VRQAPGKGLEWVGDIRLKNNYEKHYAESVKGRFTI SRDDSKSITYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGDYFDYN GQGTTVTVSS	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITTCRASESVDSEFGATFMHNYQQKPGKA FKLLIVLASRLGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCVQ NNEDPYTFGQGTKLEIK
4	L57R,L59G,L93V,H31F	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFYFLNW VRQAPGKGLEWVGDIRLKNNYEKHYAESVKGRFTI SRDDSKSITYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGDYFDYN GQGTTVTVSS	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITTCRASESVDSEFGATFMHNYQQKPGKA FKLLIVLASRLGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCVQ NNEDPYTFGQGTKLEIK
5	L57W,L59G,L93V,H31F,H55K	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFYFLNW VRQAPGKGLEWVGDIRLKNNYEKHYAESVKGRFTI SRDDSKSITYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGDYFDYN GQGTTVTVSS	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITTCRASESVDSEFGATFMHNYQQKPGKA FKLLIVLASWLGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCVQ NNEDPYTFGQGTKLEIK
6	L57R,L59G,H31F,H55K	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFYFLNW VRQAPGKGLEWVGDIRLKNNYEKHYAESVKGRFTI SRDDSKSITYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGDYFDYN GQGTTVTVSS	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITTCRASESVDSEFGATFMHNYQQKPGKA FKLLIVLASRLGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ NNEDPYTFGQGTKLEIK

7	L57R,H31F	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFY Y LNW VRQAPGKGLEWVGDIRLKSN N Y E KHYAESVKGRFTI SRDDSKSITYLQMN S LRAEDTAVYYCAREG D YFDYW GQGTTIVTVSS	DIQLTQSPSSLSASVGD R VTITCRASESVDSFGATFMHWYQ Q KPGKA PKLLIYLASRL E SGVPSRFSGSGSGTDFTLT I SSLPEDFATYYC Q NNEDPYTFGGQGTKLEIK
8	L57R,L59G,L93V ,H31F,H55K,H104T	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFY Y LNW VRQAPGKGLEWVGDIRLK K N N Y E KHYAESVKGRFTI SRDDSKSITYLQMN S LRAEDTAVYYCAREG D YFDYW GQGTTIVTVSS	DIQLTQSPSSLSASVGD R VTITCRASESVDSFGATFMHWYQ Q KPGKA PKLLIYLASRL E SGVPSRFSGSGSGTDFTLT I SSLPEDFATYYC Q NNEDPYTFGGQGTKLEIK
9	L57R,L59G,H31 F,H55K,H104T	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFY Y LNW VRQAPGKGLEWVGDIRLK K N N Y E KHYAESVKGRFTI SRDDSKSITYLQMN S LRAEDTAVYYCAREG D YFDYW GQGTTIVTVSS	DIQLTQSPSSLSASVGD R VTITCRASESVDSFGATFMHWYQ Q KPGKA PKLLIYLASRL E SGVPSRFSGSGSGTDFTLT I SSLPEDFATYYC Q NNEDPYTFGGQGTKLEIK
10	L57R,L59G,L93V ,H55K,H104T	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFY Y LNW VRQAPGKGLEWVGDIRLK K N N Y E KHYAESVKGRFTI SRDDSKSITYLQMN S LRAEDTAVYYCAREG D YFDYW GQGTTIVTVSS	DIQLTQSPSSLSASVGD R VTITCRASESVDSFGATFMHWYQ Q KPGKA PKLLIYLASRL E SGVPSRFSGSGSGTDFTLT I SSLPEDFATYYC Q NNEDPYTFGGQGTKLEIK

其中， 下划线为 CDRs 区，其他为框架区。

人源化抗体 14（抗 aPC 单克隆抗体 14）

重链

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYLNW
VRQAPGKGLEWVGDIRLKSN~~N~~Y~~E~~KHYAESVKGRFTI
SRDDSKSITYLQMN~~S~~LRAEDTAVYYCAREG~~D~~YFDYW
GQGTTIVTVSS

轻链

DIQLTQSPSSLSASVGD~~R~~VTITCRASESVDSFGATFMHWYQ~~Q~~KPGKA
PKLLIYLASRL~~E~~SGVPSRFSGSGSGTDFTLT~~I~~SSLPEDFATYYC~~Q~~
NNEDPYTFGGQGTKLEIK

其中，下划线为 CDRs 区，其他为框架区，白色字体表示人源化位点。

Protein number	mutation sites
HPAC14-1	L57W,L59G,H31F
HPAC 14-2	L57W,L93V,H31F,H55K
HPAC 14-3	L57R,L59G,L93V,H31F,H55K
HPAC 14-4	L57R,L59G,L93V,H31F
HPAC 14-5	L57W,L59G,L93V,H31F,H55K
HPAC 14-6	L57R,L59G,H31F,H55K
HPAC 14-7	L57R,H31F
HPAC 14-8	L57R,L59G,L93V,H31F,H55K,H104T
HPAC 14-9	L57R,L59G,H31F,H55K,H104T
HPAC 14-10	L57R,L59G,L93V,H55K,H104T
HAPC14	

3.2 对 HAPC14 组合突变位点构建的抗 aPC 单克隆抗体与 haPC/hPC 的结合力测定 (HAPC14-1~ HAPC14-10)

测定方法:

使用 Elisa 方法测定抗 aPC 单克隆抗体与 haPC/hPC 的结合力。

1. 用 haPC/hPC (1 μ g/mL 在 PBS 中), 100 μ L/孔, 在 4° C 下包被 ELISA 板过夜。
2. 用 PBST (0.1% Tween 20), 200 μ L/孔洗板 3 次。
3. 用 2% BSA (PBS 溶液) 封闭板, 200 μ L/孔, 室温 1 小时。
4. 用 PBST (0.1% Tween 20) 200 μ L/孔洗板 3 次。
5. 用抗 aPC 单克隆抗体作为一抗 (在 2% BSA 中从 10 μ g/mL 稀释) 100 μ L/孔孵育平板, 室温 1 小时。
6. 用 PBST (0.1% Tween 20), 200 μ L/孔清洗调色板 3 次。
7. 将板与抗 hIgG-Fc 抗体-HRP (在 2% BSA 缓冲液中稀释 5000 倍) 在室温下孵育 1 小时。
8. 用 PBST (0.1% Tween 20), 200 μ L/孔清洗调色板 6 次。
9. 用 TMB 底物孵育平板 (用 A 和 B 溶液 1:1 (v/v) 制备), 100 μ L/孔, 避光 10 分钟。
10. 用 HCl (1 M) 淬灭反应, 100 μ L/孔, 读取 OD450。

测定结果如图 3、表 4 和表 5 所示，可知，抗 aPC 单克隆抗体与 hAPC 结合且与 hPC 不结合。

表 4

Antigen	Antibody	EC50 (nM)	Span
hAPC	HAPC14-1	0.1141	2.106
	HAPC14-2	0.111	1.775
	HAPC14-3	0.0618	1.615
	HAPC14-4	0.06052	1.52
	HAPC14-5	0.09239	1.631
	HAPC14-6	0.08212	1.854
	HAPC14-7	0.1304	1.578
	HAPC14-8	0.1382	1.046
	HAPC14-9	0.07608	1.07
	HAPC14-10	0.2799	0.7453
	HAPC14	0.2203	0.2909

表 5

Antigen	Antibody	Span
hPC	HAPC14-1	0.023
	HAPC14-2	0.01042
	HAPC14-3	~ 0.2673
	HAPC14-4	0.1571
	HAPC14-5	~ 0.04753
	HAPC14-6	~ 0.01332
	HAPC14-7	~ 0.006612
	HAPC14-8	-0.004647
	HAPC14-9	0.012
	HAPC14-10	~ 0.001450
	HAPC14	~ 0.03871

3.3 使用 Octet 生物分子相互作用系统对 HAPC-14 组合突变位点构建的抗 aPC 单克隆抗体的亲和力测定（HAPC-14-1~ HAPC-14-10）

测定方法：Octet 分析是在 25° C 下使用 Protein A Octet 生物传感器在 1x Kinetics 缓冲液中进行的。动力学测定时，第一个基线步骤在 1x Kinetics 缓冲液中运行 120 秒，然后在生物传感器上加载抗体后运行 240 秒，接下来第

二个基线步骤在 1x Kinetics 缓冲液中运行 120 秒。然后将捕获抗体的生物传感器浸入含有 5 个稀释浓度（3.13、6.25、12.5、25 和 50 nM）的抗原（huAPC）孔中 180 秒，然后在 1x Kinetics 缓冲液中解离 400 秒。1x Kinetics 缓冲液作为空白对照以显示抗体在缓冲液中的自然解离。10 mM 甘氨酸 pH 1.5 用于再生步骤。使用 Octet 数据分析软件计算结合动力学，并使用 1:1 结合模型进行曲线拟合。

突变抗体的亲和力测定 pH7.4。结果如图 4、表 6 所示：

表 6

Sample	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	Full R^2
HAPC14-1	3.83E-09	3.06E+05	1.17E-03	0.9932
HAPC14-2	3.78E-09	3.07E+05	1.16E-03	0.9877
HAPC14-3	2.67E-09	3.20E+05	8.54E-04	0.9933
HAPC14-4	4.06E-09	3.10E+05	1.26E-03	0.9911
HAPC14-5	2.83E-09	3.22E+05	9.11E-04	0.9924
HAPC14-6	3.64E-09	2.97E+05	1.08E-03	0.9917
HAPC14-7	7.72E-09	2.56E+05	1.97E-03	0.9929
HAPC14-8	1.05E-08	2.50E+05	2.62E-03	0.9901
HAPC14-9	9.69E-09	2.45E+05	2.38E-03	0.9917
HAPC14-10	1.90E-08	2.25E+05	4.28E-03	0.9906
HAPC14	2.54E-07	6.40E+04	1.62E-02	0.9866

从图 4、表 6 结果可以看出，突变后的抗体仍旧可以与 haPC 结合，而并不能与 hPC 结合，且亲和力与未突变的 14 号抗体 HAPC-14 相比，均有提高，尤其是 6 号（HAPC14-6）和 3 号（HAPC14-3）有近 100 倍的提高。

实施例 4 抗 aPC 单克隆抗体 HAPC14-6 和 aPC 对组蛋白的裂解作用

测定方法：

试剂	含量 (ug/μL)	孵育
每管含小牛胸腺组蛋白	0.2	37℃ 4h
每管含或不含 aPC	含 aPC 时，含量为 0.012	
每管含或不含 HAPC	含 HAPC 时，含量为 0.06	

加入 PBS Buffer pH7.3 至反应体积 100ul	
---------------------------------	--

经 SDS-PAGE 凝胶电泳后考马斯亮蓝染色，观察 HAPC 单克隆抗体促进或抑制 aPC 裂解组蛋白。

测定结果如图 5 所示(图 5 从左至右依次为:仅含组蛋白;含组蛋白和 APC;含组蛋白、APC 和 HAPC1573;含组蛋白、APC 和 HAPC14-6)，由图可知，HAPC1573 和 HAPC14-6 增强 aPC 裂解组蛋白能力,预示本发明 HAPC14-6 单克隆抗体可以提供针对组蛋白 H3 和 H4 细胞毒性的细胞保护作用。

同 HAPC1573 一致的，HAPC-14-6 不抑制而是实际上增强 aPC 裂解组蛋白 H3 和 H4。与 HAPC1573 不同的是 HAPC-14-6 轻微抑制 aPC 裂解组蛋白 H1。预示 HAPC-14-6 可以提供针对组蛋白 H3 和 H4 细胞毒性的细胞保护作用。

实施例 5 抗 aPC 单克隆抗体 HAPC-14-3、HAPC-14-6 体外药效学研究

本实施例测定不同抗体不同浓度对乏凝血因子血浆的影响。

使用 protc 诱导的 APTT 实验检测抗单克隆抗体在多种凝血因子缺乏的人血浆中抑制 aPC 抗凝活性最小剂量,最多仅需 1ug/ml 的浓度便可抑制 95%以上 aPC 抗凝活性，而 HAPC1573 需要 100ug/ml 以上的浓度。

5.1 实验方法和原理

活化部分凝血活酶时间（APTT）测定原理：37℃条件下，以白陶土激活因子XII和XI，以脑磷脂（部分凝血活酶）代替血小板第三因子，在 Ca²⁺参与下，观察血浆凝固所需的时间，即为活化部分凝血活酶时间。其是内源凝血系统较敏感和最为常用的筛选试验。

新开发的抗 aPC 单克隆抗体 HAPC-14-6 在至多 1μg/ml 的浓度下，便可以在多种凝血因子缺乏的人血浆中抑制 aPC 抗凝活性。包括乏凝血因子 V、乏凝血因子 VII、乏凝血因子 VIII、乏凝血因子 IX、乏凝血因子 X、乏凝血因子 XI、乏凝血因子 XII、乏 VWF 等。

5.2 抗体对凝血因子缺乏血浆的影响测定

(1) 不同抗体不同浓度对凝血因子 VIII 和 VIX 缺乏血浆实验结果

实验方法：抗体用 OWREN-KOLLER 缓冲液稀释至对应浓度；

凝血因子 FVIII 缺乏血浆+表 7 各稀释度抗体（终浓度）+0.05U/ml Protac（终浓度）+OWREN-KOLLER 缓冲液，室温 15min；

150μl

共 150ul

对照：凝血因子 FVIII 缺乏血浆 150 μ l+ OWREN-KOLLER 缓冲液 150 μ l;

测定方法: STAGO Compact Max APTT-程序。

凝血因子 FIX 缺乏血浆+表 7 各稀释度抗体（终浓度）+0.01U/ml Protac（终浓度）+OWREN-KOLLER 缓冲液，室温 15min；

150μl

共 150ul

对照：凝血因子 FIX 缺乏血浆 150 μ l+ OWREN-KOLLER 缓冲液 150 μ l;

测定方法: STAGO Compact Max APTT-程序。

测定结果：如表 7 所示，凝血因子 VIII 和 VIX 缺乏血浆中，抗 aPC 单克隆抗体 HAPC14-1~HAPC14-10 均可以不同程度抑制 aPC 抗凝活性。且相同抗体浓度下，抗 aPC 单克隆抗体 HAPC14-1~HAPC14-10 抑制 aPC 抗凝活性的效果均优于鼠抗 1573、HAPC13 和 HAPC14。

表 7

抗体	APC 抗体浓度 (μ g/ml)	凝固时间均值 (s)	
		乏 FVIII 血浆	乏 FIX 血浆
1573	5	388.9	403.5
	1	629	566.8
	0.5	600	584.2
HAPC-13	5	300.7	325.7
	1	546.3	402.3
	0.5	628.8	502.1
HAPC-14	5	324.4	310.2
	1	457.3	415.3
	0.5	574.5	457
HAPC14-1	5	165.8	171.3
	1	222.5	194.6
	0.5	327.1	219.3
HAPC14-2	5	158.9	142.9
	1	195.6	210.8
	0.5	358.4	233.2
HAPC14-3	5	176.4	185.1
	1	188	199.6
	0.5	205.2	208.4
HAPC14-4	5	158.3	176.2

	1	184.3	193.7
	0.5	220.6	219.6
HAPC14-5	5	171.2	166.1
	1	200.2	187.5
	0.5	223.9	197.4
HAPC14-6	5	161.7	179.5
	1	186.9	198.5
	0.5	182.3	181.3
HAPC14-7	5	175.5	146.5
	1	197.9	145.4
	0.5	296.7	240.9
HAPC14-8	0.5	189.7	276.4
	0.1	251.9	392
	0.05	315.9	732
HAPC14-9	0.5	181.6	170
	0.25	—	497.8
	0.1	217.3	610.8
	0.05	261.6	670.1
HAPC14-10	1	—	158.2
	0.5	254.5	330.7
	0.1	309.1	595.5
	0.05	414.6	733.3

(2) 不同抗体不同浓度对凝血因子 FVIII 缺乏血浆实验结果

实验方法：抗体用 OWREN-KOLLER 缓冲液稀释至对应浓度；

凝血因子 FVIII 缺乏血浆+图 6A 各稀释度抗体（终浓度）+0.05U/ml Protac

（终浓度）+OWREN-KOLLER 缓冲液，室温 15min；

150μl 共 150ul

对照：凝血因子 FVIII 缺乏血浆 150μl+ OWREN-KOLLER 缓冲液 150μl；

测定方法：STAGO Compact Max APTT-程序。

实验结果：如图 6A 所示，凝血因子 FVIII 缺乏血浆中，抗 aPC 单克隆抗体完全抑制 aPC 抗凝活性。

(3) 不同抗体不同浓度对凝血因子 FIX 缺乏血浆实验结果

实验方法：抗体用 OWREN-KOLLER 缓冲液稀释至对应浓度；

凝血因子 FIX 缺乏血浆+图 6B 各稀释度抗体（终浓度）+0.01U/ml Protac（终浓度）+OWREN-KOLLER 缓冲液，室温 15min；

150μl

共 150ul

对照：凝血因子 FIX 缺乏血浆 150μl+ OWREN-KOLLER 缓冲液 150μl；

测定方法：STAGO Compact Max APTT-程序。

测定结果：如图 6B 所示，凝血因子 FIX 缺乏血浆中，抗 aPC 单克隆抗体完全抑制 aPC 抗凝活性。

（4）不同抗体不同浓度对凝血因子 FXI 缺乏血浆实验结果

实验方法：抗体用 OWREN-KOLLER 缓冲液稀释至对应浓度；

凝血因子 FXI 缺乏血浆+图 6C 各稀释度抗体（终浓度）+0.06U/ml Protac（终浓度）+OWREN-KOLLER 缓冲液，室温 15min；

150μl

共 150ul

对照：凝血因子 FXI 缺乏血浆 150μl+ OWREN-KOLLER 缓冲液 150μl；

测定方法：STAGO Compact Max APTT-程序。

测定结果：如图 6C 所示，凝血因子 FXI 缺乏血浆中，抗 aPC 单克隆抗体完全抑制 aPC 抗凝活性。

（5）不同抗体不同浓度对凝血因子 FVII 血浆实验结果

实验方法：抗体用 OWREN-KOLLER 缓冲液稀释至对应浓度；

凝血因子 FVII 缺乏血浆+图 6D 各稀释度抗体（终浓度）+0.1U/ml Protac（终浓度）+OWREN-KOLLER 缓冲液，室温 15min；

150μl

共 150ul

对照：凝血因子 FVII 缺乏血浆 150μl+ OWREN-KOLLER 缓冲液 150μl；

测定方法：STAGO Compact Max APTT-程序。

测定结果：如图 6D 所示，凝血因子 FVII 缺乏血浆中，抗 aPC 单克隆抗体完全抑制 aPC 抗凝活性。

（6）不同抗体不同浓度对凝血因子 FXII 缺乏血浆实验结果

实验方法：抗体用 OWREN-KOLLER 缓冲液稀释至对应浓度；

凝血因子 FXII 缺乏血浆+图 6E 各稀释度抗体（终浓度）+0.025U/ml Protac（终浓度）+OWREN-KOLLER 缓冲液，室温 15min；

150μl

共 150ul

对照：凝血因子 FXII 缺乏血浆 150 μ l+ OWREN-KOLLER 缓冲液 150 μ l;

测定方法: STAGO Compact Max APTT-程序;

测定结果：如图 6E 所示，凝血因子 FXII 缺乏血浆中，抗 aPC 单克隆抗体完全抑制 aPC 抗凝活性。

(7) 不同抗体不同浓度对凝血因子 FV 血浆实验结果

实验方法: 抗体用 OWREN-KOLLER 缓冲液稀释至对应浓度;

凝血因子 FV 缺乏血浆（含 5%标准血浆）+图 6F 各稀释度抗体（终浓度）
+0.05U/ml Protac（终浓度）+OWREN-KOLLER 缓冲液，室温 15min;

150μl 共 150ul

对照：凝血因子 FV 缺乏血浆（含 5%标准血浆） 150μl+ OWREN-KOLLER
缓冲液 150μl;

测定方法: STAGO Compact Max APTT-程序。

测定结果：如图 6F 所示，凝血因子 FV 缺乏血浆中，抗 aPC 单克隆抗体完全抑制 aPC 抗凝活性。

(8) 不同抗体不同浓度对凝血因子 FX 缺乏血浆实验结果

实验方法: 抗体用 OWREN-KOLLER 缓冲液稀释至对应浓度;

凝血因子 FX 缺乏血浆（含 1%标准血浆）+图 6G 各稀释度抗体（终浓度）+0.05U/ml Protac（终浓度）+OWREN-KOLLER 缓冲液，室温 15min;

150μl 共 150ul

对照：凝血因子 FX 缺乏血浆（含 1%标准血浆） 150μl+ OWREN-KOLLER
缓冲液 150μl;

测定方法: STAGO Compact Max APTT-程序。

测定结果：如图 6G 所示，凝血因子 FX 缺乏血浆中，抗 aPC 单克隆抗体完全抑制 aPC 抗凝活性。

(9) 不同抗体不同浓度对凝血因子 VWF 缺乏血浆实验结果

实验方法：抗体用 OWREN-KOLLER 缓冲液稀释至对应浓度；

凝血因子 VWF 缺乏血浆+图 6H 各稀释度抗体（终浓度）+0.01U/ml Protac
（终浓度）+OWREN-KOLLER 缓冲液，室温 15min;

150μl 共 150ul

对照：凝血因子 VWF 缺乏血浆 150 μ l+ OWREN-KOLLER 缓冲液 150 μ l。

测定方法：STAGO Compact Max APTT-程序。

测定结果：如图 6H 所示，凝血因子 VWF 缺乏血浆中，抗 aPC 单克隆抗体完全抑制 aPC 抗凝活性。

实施例 6 体内药效学实验

在人源化蛋白 C 血友病小鼠模型中（见中国专利申请 CN201911027061.6 第 [0230]~[0238]段），注射一定剂量的抗 aPC 单克隆抗体后，通过考察小鼠断尾后的出血量情况来检查抗 aPC 单克隆通过抑制 aPC 的抗凝血功能来达到凝血效果。

6.1 实验方法

通过小鼠眼角静脉注射给药。给药 1 小时后，腹腔注射戊巴比妥钠麻醉小鼠。麻醉后从距小鼠尾梢末端 2 毫米处切断鼠尾，将鼠尾伤口置于 15 毫升 37℃ 的生理盐水中收集小鼠流出的血液。20 分钟后停止收集。收集液裂解红细胞后离心收集上清，上清液使用紫外分光光度计在 600nm 波长下检测，用测的 OD 值来表示小鼠的出血量，小鼠的出血量用来衡量小鼠的凝血功能。WT 为正常小鼠，untreated 为未给药的人源化蛋白 C 血友病 A 小鼠或未给药的人源化蛋白 C 血友病 B 小鼠。

6.2 实验结果

如图 7A 所示，人源化蛋白 C 血友病 A 小鼠中，分别注射 1U/每只小鼠的凝血因子 FVIII，20 μ g/每只小鼠的鼠抗 1573、1 μ g/每只小鼠的 HAPC-14-6。注射新的抗 APC 单克隆抗体 HAPC-14-6 的小鼠的凝血功能恢复到正常小鼠的水平，和用凝血因子 FVIII 治疗的小鼠效果一致。

如图 7B 所示，人源化蛋白 C 血友病 A 小鼠中，分别注射不同剂量的 HAPC-14-6，至多 1 μ g 的 HAPC-14-6 就可以使缺陷小鼠凝血功能恢复至正常水平。

如图 7C 所示，人源化蛋白 C 血友病 B 小鼠中，分别注射不同剂量的 HAPC-14-6，至多 1 μ g 的 HAPC-14-6 便可以使缺陷小鼠凝血功能恢复至正常水平。

结果说明，本发明中，使用蛋白 C 激活酶（protac）诱导的 APTT 实验检测抗 aPC 单克隆抗体在多种凝血因子缺乏的人血浆中抑制 aPC 抗凝活性最小剂量，

最多仅需 1 μ g/ml 的浓度便可完全抑制，而鼠抗 HAPC1573 需要 100 μ g/ml 以上的浓度。

以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对其限制；尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细的说明，所属领域的普通技术人员应当理解：依然可以对本发明的具体实施方式进行修改或者对部分技术特征进行等同替换；在不背离发明构思的精神和范围下，本领域技术人员能够想到的变化和优点均应涵盖在本发明请求保护的技术方案范围当中。

权 利 要 求 书

1. 一种抗 aPC 单克隆抗体，其特征在于，所述抗 aPC 单克隆抗体的重链 CDR 区和/或轻链 CDR 区包括如下突变中的一项或多项：
 - 1) 相对于 SEQ ID NO: 31 所示的轻链 CDR2 包括 N57R 和/或 N57W 突变；
 - 2) 相对于 SEQ ID NO: 31 所示的轻链 CDR2 包括 E59G 和/或 E59P 突变；
 - 3) 相对于 SEQ ID NO: 32 所示的轻链 CDR3 包括 Q93V 突变；
 - 4) 相对于 SEQ ID NO: 27 所示的重链 CDR1 包括 N31F 突变；
 - 5) 相对于 SEQ ID NO: 28 所示的重链 CDR2 包括 S55K 突变；
 - 6) 相对于 SEQ ID NO: 29 所示的重链 CDR3 包括 Y104T 突变。
2. 根据权利要求 1 所述的抗 aPC 单克隆抗体，其特征在于，所述抗 aPC 单克隆抗体突变前的原始序列包括：
 - i) 包含 SEQ ID NO: 27 所示的重链 CDR1, SEQ ID NO: 28 所示的重链 CDR2, 以及 SEQ ID NO: 29 所示的重链 CDR3 的重链；和，
 - ii) 包含 SEQ ID NO: 30 所示的轻链 CDR1, SEQ ID NO: 31 所示的轻链 CDR2, 以及 SEQ ID NO: 32 所示的轻链 CDR3 的轻链。
3. 根据权利要求 1 所述的抗 aPC 单克隆抗体，其特征在于，所述抗 aPC 单克隆抗体的轻链 CDR2 相对于 SEQ ID NO: 31 所示的轻链 CDR2 包括 N57R 和 E59G 突变。
4. 根据权利要求 1 所述的抗 aPC 单克隆抗体，其特征在于，其选自以下其一：
 - 包含 (a) 由 SEQ ID NO: 27、28 和 29 表示的重链 CDR；和/或，
 - (b) 由 SEQ ID NO:30、31 和 32 表示的轻链 CDR 的抗体；
 - 包含 (c) 由 SEQ ID NO: 33、34 和 35 表示的重链 CDR；和/或，
 - (d) 由 SEQ ID NO:36、37 和 38 表示的轻链 CDR 的抗体；
 - 包含 (e) 由 SEQ ID NO: 39、40 和 41 表示的重链 CDR；和/或，
 - (f) 由 SEQ ID NO: 42、43 和 44 表示的轻链 CDR 的抗体；
 - 包含 (g) 由 SEQ ID NO: 45、46 和 47 表示的重链 CDR；和/或，
 - (h) 由 SEQ ID NO: 48、49 和 50 表示的轻链 CDR 的抗体；
 - 包含 (i) 由 SEQ ID NO:51、52 和 53 表示的重链 CDR；和/或，
 - (j) 由 SEQ ID NO: 54、55 和 56 表示的轻链 CDR 的抗体；
 - 包含 (k) 由 SEQ ID NO: 57、58 和 59 表示的重链 CDR；和/或，
 - (l) 由 SEQ ID NO: 60、61 和 62 表示的轻链 CDR 的抗体；

包含 (m) 由 SEQ ID NO: 63、64 和 65 表示的重链 CDR; 和/或,

(n) 由 SEQ ID NO: 66、67 和 68 表示的轻链 CDR 的抗体;

包含 (o) 由 SEQ ID NO: 69、70 和 71 表示的重链 CDR; 和/或,

(p) 由 SEQ ID NO: 72、73 和 74 表示的轻链 CDR 的抗体;

包含 (q) 由 SEQ ID NO: 75、76 和 77 表示的重链 CDR; 和/或,

(r) 由 SEQ ID NO: 78、79 和 80 表示的轻链 CDR 的抗体;

包含 (s) 由 SEQ ID NO: 81、82 和 83 表示的重链 CDR; 和/或,

(t) 由 SEQ ID NO: 84、85 和 86 表示的轻链 CDR 的抗体;

包含 (u) 由 SEQ ID NO: 87、88 和 89 表示的重链 CDR; 和/或,

(v) 由 SEQ ID NO: 90、91 和 92 表示的轻链 CDR。

5. 根据权利要求 4 所述的抗 aPC 单克隆抗体, 其特征在于, 包含:

如 SEQ ID NO: 5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25 任一序列所示的重链;
和/或,

如 SEQ ID NO: 6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26 任一序列所示的轻链。

6. 根据权利要求 4 所述的抗 aPC 单克隆抗体, 其特征在于, 选自以下:

包含如 SEQ ID NO:5 所示的重链以及如 SEQ ID NO:6 所示的轻链的抗体;

包含如 SEQ ID NO:7 所示的重链以及如 SEQ ID NO:8 所示的轻链的抗体;

包含如 SEQ ID NO:9 所示的重链以及如 SEQ ID NO:10 所示的轻链的抗体;

包含如 SEQ ID NO:11 所示的重链以及如 SEQ ID NO:12 所示的轻链的抗体;

包含如 SEQ ID NO:13 所示的重链以及如 SEQ ID NO:14 所示的轻链的抗体;

包含如 SEQ ID NO:15 所示的重链以及如 SEQ ID NO:16 所示的轻链的抗体;

包含如 SEQ ID NO:17 所示的重链以及如 SEQ ID NO:18 所示的轻链的抗体;

包含如 SEQ ID NO:19 所示的重链以及如 SEQ ID NO:20 所示的轻链的抗体;

包含如 SEQ ID NO:21 所示的重链以及如 SEQ ID NO:22 所示的轻链的抗体;

包含如 SEQ ID NO:23 所示的重链以及如 SEQ ID NO:24 所示的轻链的抗体;

包含如 SEQ ID NO:25 所示的重链以及如 SEQ ID NO:26 所示的轻链的抗体。

7. 根据权利要求 1 所述的抗 aPC 单克隆抗体, 其特征在于, 所述抗 aPC 单克隆抗体是完整抗体或其抗体片段; 其中, 所述抗体片段为 Fab'、Fab、F(ab')₂、单结构域抗体、Fv 或 scFv。

8. 根据权利要求 1~7 之任一项所述的抗 aPC 单克隆抗体相关的生物材料,其特征在于,为以下 1)至 3)中任一:

- 1) 编码根据权利要求 1 所述的抗 aPC 单克隆抗体的核酸分子;
- 2) 含有 1)所述核酸分子的构建体;
- 3) 含有 1)所述核酸分子的表达系统。

9. 一种制剂产品,其特征在于,所述制剂产品为药物组合物或检测试剂盒;所述制剂产品包含根据权利要求 1 所述的抗 aPC 单克隆抗体或根据权利要求 8 所述的生物材料之任意的一种或几种;

当所述制剂产品为药物组合物时,其还包含药学上可接受的载体。

10. 一种治疗凝血相关的方法,其特征在于,包括向有治疗有需要的个体施用有效量的根据权利要求 1~7 之任一项所述的抗 aPC 单克隆抗体或根据权利要求 8 所述的生物材料之任意的一种或几种;其中,所述个体患有凝血缺乏或缺陷病症,或所述个体需要血液凝固治疗,或所述个体患有败血病或血友病,或所述个体需要调节止血。

11. 根据权利要求 1~7 之任一项所述的抗 aPC 单克隆抗体或根据权利要求 9 所述的生物材料的下述任一种或几种用途:

- i) 在制备预防和/或治疗凝血缺乏或缺陷病症的药物中的应用;
- ii) 在制备增强 aPC 裂解组蛋白 H3 和 H4 能力的促进剂中的应用;
- iii) 在制备抑制个体中的活化蛋白 C 抗凝活性的药物中的应用;
- iv) 在制备治疗需要血液凝固的个体的药物中的应用;
- vi) 在制备调节个体止血的药物中的应用;
- vii) 在疾病或非疾病诊断治疗目的的免疫学检查分析或在制备 aPC 的检测试剂或试剂盒中的应用;
- viii) 在与其他试剂或药物联合使用中的应用。

12. 根据权利要求 12 所述的用途,其特征在于,所述凝血缺乏或缺陷病症包括因凝血因子缺乏造成凝血障碍并引起出血的病症,以及由创伤、手术引起的凝血紊乱。

13. 根据权利要求 12 所述的用途,其特征在于,所述凝血缺乏或缺陷病症包括血友病、败血病、创伤性出血。

□